

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AM

(11)Publication number : 09-124472

(43)Date of publication of application : 13.05.1997

(51)Int.Cl.

A61K 31/19  
A61K 31/19  
A61K 31/19  
A61K 31/19  
A61K 31/19  
C12N 9/99

(21)Application number : 07-303897

(71)Applicant : NOEVIR CO LTD

(22)Date of filing : 27.10.1995

(72)Inventor : SAKAKI SACHIKO  
MASAKI HITOSHI

## (54) INHIBITOR OF COLLAGENASE

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain an inhibitor of collagenases, containing one or more dicarboxylic acids, excellent in stability and safety, capable of manifesting excellent inhibiting actions on the collagenases in a small dose and useful for relieving and treating aging of the skin, metabolic diseases, etc.

**SOLUTION:** This inhibitor of collagenases contains one or more dicarboxylic acids (preferably a 5-12C saturated dibasic acid, e.g. glutaric acid, adipic acid, pimelic acid, etc.) and preferably further one or more metallic chelating agents (e.g. deferoxamine, Na salt of ethylenediaminetetraacetic acid, phosphoric acid or citric acid) used in combination. The dicarboxylic acid is blended in an amount of preferably about 0.01-10.0wt.% based on the total amount of the resultant pharmaceutical preparation.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 05.04.2002  
[Date of sending the examiner's decision of rejection]  
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-124472

(43) 公開日 平成9年(1997)5月13日

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

A61K 31/19

識別記号

F I

ADD

A61K 31/19

ADD

ABE

ABE

ABG

ABG

ADA

ADA

AED

AED

審査請求 未請求 請求項の数 3 FD (全5頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平7-303897

(22) 出願日

平成7年(1995)10月27日

(71) 出願人 000135324

株式会社ノエビア

兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目13番地  
の1

(72) 発明者 横 幸子

滋賀県八日市市岡田町字野上112-1 株  
式会社ノエビア滋賀中央研究所内

(72) 発明者 正木 仁

滋賀県八日市市岡田町字野上112-1 株  
式会社ノエビア滋賀中央研究所内

(74) 代理人 竹井 増美

(54) 【発明の名称】コラゲナーゼ阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 高いコラゲナーゼ阻害活性を示し、しかも副作用がなく安全で、さらに種々の製剤基剤中での安定性の高いコラゲナーゼ阻害剤を得る。

【解決手段】 ジカルボン酸の1種又は2種以上を基剤に配合する。ジカルボン酸としては、炭素数5~22の飽和二塩基酸が好ましい。さらに金属キレート剤の1種又は2種以上を併用すると、コラゲナーゼ阻害作用を相乗的に強化することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ジカルボン酸の 1 種又は 2 種以上を含有して成るコラゲナーゼ阻害剤。

【請求項 2】 ジカルボン酸の 1 種又は 2 種以上と、金属キレート剤の 1 種又は 2 種以上とを含有して成るコラゲナーゼ阻害剤。

【請求項 3】 ジカルボン酸が、炭素数 5 ~ 炭素数 12 の飽和二塩基酸であることを特徴とする、請求項 1 又は請求項 2 に記載のコラゲナーゼ阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は、結合組織の構成タンパク質であるコラーゲンを特異的に切断し、皮膚の老化、骨粗しょう症等の代謝性疾患、炎症性疾患、リューマチ関節炎、骨関節炎等の関節性疾患などの緩和、治療に副作用なく安全に使用し得るコラゲナーゼ阻害剤に関する。さらに詳しくは、ジカルボン酸或いはこれと金属キレート剤を含有して成るコラゲナーゼ阻害剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 コラーゲンは動物の結合組織を構成する主要タンパク質であり、種々の組織において I 型 ~ XII I 型の 13 種類の存在が知られている。コラゲナーゼは、かかるコラーゲンタンパク質を特異的に切断する酵素であり、加齢や紫外線による皮膚のしわの発生や粘弹性の低下、骨粗しょう症等の代謝性疾患、表皮水疱症、角膜潰瘍、歯根病等の炎症性疾患、リューマチ関節炎、骨関節炎等の関節性疾患など、実に幅広く多くの疾患に関与する。

【0003】 従って、コラゲナーゼ活性を阻害することにより、上記のような疾患を緩和或いは治療する試みが多くなされており、コラゲナーゼ阻害剤として、羊膜由来物質（特開平 6-345636）、ソバ殻タンパク質抽出物（国際公開 9420541）、ケイガイ、ハッカ抽出物（特開平 6-183990）、水溶性糖誘導体（特開平 6-183941）、ラクトフェリン（特開平 5-186368）、コーヒー酸又はその塩（特開平 5-117145）、アスコルビン酸、エリソルビン酸及びこれらの塩の混合物（特開平 4-290819）、アセチルポリアミド（フランス国特許 2669629）、ガロタニン（特開平 4-66524）、 $\kappa$ -カゼイン（特開平 4-41417）、カカオ殻の抽出物（特開平 3-44331）、ヒドロキサム酸テトラペプチド（特開平 1-160997）、1,3-ビス-置換-ナフチルアミノカルボニルフェニル尿素誘導体（特公昭 63-8101）などが開示されている。

【0004】 また、コラゲナーゼは金属プロテアーゼであるため、ディフェロキサミン（deferoxamine）、エチレンディアミン四酢酸（ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA）塩、酒石酸、クエン酸等の金属キレ

ト剤もコラゲナーゼ阻害剤として用いられる。

【0005】 しかしながら、少量で高い阻害活性を示し、しかも副作用が少なくさらに安定性の高いコラゲナーゼ阻害剤としては、いまだに満足なものが得られていないのが現状である。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、本発明は少量の適用で高いコラゲナーゼ阻害活性を示し、しかも副作用がなく安全で、さらに種々の製剤基剤中で安定性が高く、いろいろな剤型の医薬品や化粧料等に応用することのできるコラゲナーゼ活性阻害剤を得ることを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決するため、種々の物質のコラゲナーゼ阻害活性をスクリーニングした結果、ジカルボン酸類がやはり金属キレート作用を有し、しかも生体に対する作用が穏和で副作用がほとんどなく、また種々の形態の基剤中で安定であることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0008】 本発明においては、ジカルボン酸より 1 種又は 2 種以上を選択して基剤に配合する。ジカルボン酸としては、グルタル酸、アジピン酸、ビメリン酸、スペリン酸、アゼライン酸、セバシン酸、1,9-ノナメチレンジカルボン酸、1,10-デカメチレンジカルボン酸の炭素数 5 ~ 12 の飽和二塩基酸が特に好ましい。配合量としては、製剤全量に対して 0.01 重量% ~ 10.0 重量% 程度が適当である。

【0009】 また、ジカルボン酸の 1 種又は 2 種以上に加えて金属キレート剤の 1 種又は 2 種以上を併用すると、コラゲナーゼ阻害活性が相乗的に増強される。金属キレート剤としては、ディフェロキサミン（deferoxamine）、エチレンジアミン四酢酸（ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA）のナトリウム塩、リン酸、クエン酸、アスコルビン酸、コハク酸、グルコン酸、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等が挙げられ、これらより 1 種又は 2 種以上を選択して配合する。

## 【0010】

【作用】 本発明のコラゲナーゼ阻害剤は、少量の添加で優れたコラゲナーゼ阻害作用を示し、且つ生体に対する作用が穏和で、製剤中における安定性にも優れる。その結果、本発明のコラゲナーゼ阻害剤の適用により、加齢や紫外線による皮膚のしわの発生や粘弹性の低下、骨粗しょう症等の代謝性疾患、表皮水疱症、角膜潰瘍、歯根病等の炎症性疾患、リューマチ関節炎、骨関節炎等の関節性疾患などを緩和或いは治療することができ、また、創傷の治癒をも促進する。

【0011】 一例として、アゼライン酸のコラゲナーゼ阻害作用について以下に示す。コラゲナーゼを最終濃度で 0 ~ 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含む水溶液に、アゼライン酸を最終濃度が 8  $\text{mM}$  及び 16  $\text{mM}$  となるように加え、次いでフルオレ

セインイソチオシアネート(FITC)標識を行ったコラーゲンを最終濃度40μg/mlとなるように加えて、37℃で1時間インキュベーションした。エタノール添加により酵素反応を停止させた後、未反応のFITC標識コラーゲンを除去するため遠心分離を行い、上清中の蛍光強度を励起波長495nm、蛍光波長520nmで測定し

コラゲナーゼ量 (μg/ml)	対照	アゼライン酸	
		8mM(阻害率, %)	16mM(阻害率, %)
0	40. 88	27. 83	27. 80
1. 5	95. 40	59. 74(41.5)	44. 76(68.9)
7. 5	184. 40	103. 20(47.5)	68. 56(71.6)
15. 0	366. 67	150. 50(52.3)	119. 67(71.8)

表1には、式(1)により求めたコラゲナーゼ阻害率を併記した。これより、アゼライン酸はコラゲナーゼによるFITCの遊離に対して、8mMで48～58%程度、16mMで28～31%程度まで抑制することが示され

$$\text{コラゲナーゼ阻害率} (\%) = \left( 1 - \frac{I_{sc} - I_{so}}{I_{sc} - I_{s0}} \right) \times 100 \quad \cdots (1)$$

但し、  
 $I_{sc}$ : コラゲナーゼ添加時のアゼライン酸添加試料の蛍光強度  
 $I_{so}$ : コラゲナーゼ無添加時のアゼライン酸添加試料の蛍光強度  
 $I_{s0}$ : コラゲナーゼ添加時の対照の蛍光強度  
 $I_{o0}$ : コラゲナーゼ無添加時の対照の蛍光強度

### [0013]

【発明の実施の形態】本発明に係るコラゲナーゼ阻害剤は、粉末状、水性懸濁液、アルコール等の極性有機溶媒を含む水性基剤に可溶化した形態或いは乳剤の形態で提供でき、食品、飲料、医薬品、化粧料等に添加、配合して用いることができる。食品においては、油脂製品や乳化製品、清涼飲料等に添加することができる。医薬品では、経口製剤、注射剤、皮膚外用剤等への添加が考えられる。化粧料としては、化粧水、乳液、クリーム等の他、洗口剤など口腔用組成物への添加も可能である。

### [0014]

【実施例】さらに本発明の特徴について、実施例により詳細に説明する。まず、本発明の実施例1～実施例3として、含エタノール水性製剤タイプのコラゲナーゼ阻害剤について表2に示す。表2中、ジカルボン酸をエタノールに溶解し、キレート剤を溶解した精製水と混合、可溶化して調製する。

### 【表2】

た。アゼライン酸を含まない溶媒のみを添加した系についても同様に蛍光強度を測定し、対照とした。結果は表1に示す。

### 【0012】

#### 【表1】

た。すなわち、コラゲナーゼ阻害率はアゼライン酸の濃度に依存して増加し、8mMで41.5～52.3、16mMで68.9～71.8%となった。

### 【数1】

成 分	配合量(重量%)		
	実施例1	実施例2	実施例3
ジカ グルタル酸	0. 1	—	—
ルボ ピメリン酸	—	0. 1	—
ン酸 アゼライン酸	0. 1	0. 1	0. 2
キレ デフェロキサミン	0. 1	—	—
ート EDTA・2Na	—	0. 1	—
剤 クエン酸	—	—	0. 1
エタノール	50. 0	50. 0	50. 0
精製水	49. 7	49. 7	49. 7

【0015】表3には、乳剤タイプのコラゲナーゼ阻害剤である実施例4～実施例6の処方を示した。表3中、油相にジカルボン酸を添加して75℃に加熱して溶解、均一化する。一方、水相にキレート剤を添加して加熱、溶解して75℃に保ち、これに前記油相成分を徐々に添加して乳化した後、冷却して調製する。

### 【表3】

成 分	配合量 (重量%)			
	実施例4	実施例5	実施例6	
油相	セタノール	2.10	2.10	2.10
	軽質流動パラフィン	20.00	20.00	20.00
	ソルビタンモノステアレート	1.00	1.00	1.00
	ポリオキシエチレン(20)			
	ソルビタンモノステアレート	5.00	5.00	5.00
ジカルボン酸	アジピン酸	0.05	-	0.05
ルボン酸	スペリジ酸	-	0.05	0.05
ン酸	セバシン酸	0.10	0.10	0.05
キレート剤	EDTA・2Na	0.05	0.05	-
水相	コハク酸	0.05	-	0.05
水相	ポリリン酸ナトリウム	-	0.05	0.05
水相	パラオキシ安息香酸メチル	0.10	0.10	0.10
水相	精製水	71.55	71.55	71.55

【0016】表4には、クリームタイプのコラゲナーゼ阻害剤である実施例7～実施例9の処方を示した。表4中、油相にジカルボン酸を添加して75℃に加熱して溶解、均一化する。一方、水相にキレート剤を添加して加

熱、溶解して75℃に保ち、これに前記油相成分を徐々に添加して乳化した後、冷却して調製する。

【表4】

成 分	配合量 (重量%)			
	実施例7	実施例8	実施例9	
油相	ミツロウ	6.0	6.0	6.0
	セタノール	5.0	5.0	5.0
	還元ラノリン	8.0	8.0	8.0
	スクワラン	37.5	37.5	37.5
	親油型グリセリルモノステアレート	2.0	2.0	2.0
ジカルボン酸	ポリオキシエチレン(20)			
	ソルビタンモノステアレート	2.0	2.0	2.0
	アゼライン酸	0.2	0.2	0.1
	1,9-ノナメチレンジカルボン酸	0.1	-	0.1
	1,10-デカメチレンジカルボン酸	-	0.1	0.1
キレート剤	アスコルビン酸	-	0.1	-
水相	グルコン酸	-	-	0.2
水相	メタリン酸ナトリウム	-	0.1	-
水相	パラオキシ安息香酸メチル	0.1	0.1	0.1
水相	精製水	39.1	38.9	38.9

【0017】上記の本発明の実施例について、炎症性潰瘍に対する治癒効果を評価した。マウス5匹を1群とし、背部に界面活性剤処理により炎症性潰瘍を生じさせた。この部位に試料を1日2回0.5gずつ7日間塗布し、7日後の潰瘍の治癒状況を観察した。治癒状況は「完全治癒」、「ほぼ治癒」、「治癒不完全」の3段階にて評価し、各評価を得たマウスの数を示した。なお、表2～表4において、ジカルボン酸をガロタニンニンに、キレート剤としてアスコルビン酸を用いたものをそれぞれ比較例1～比較例3とした。

【0018】また、製剤を25℃で3ヶ月間保存した際の安定性及び皮膚刺激性についても評価した。保存安定性は「○；状態の変化は認められない」、「△；変退色或いは成分の分離が若干認められる」、「×；変退色或

いは成分の分離が顕著に認められる」として評価し、皮膚刺激性は男性ペネラー20名による48時間閉塞貼付試験により、表5に示す判定基準に従って皮膚刺激指数を求め、20名の平均値を算出して評価した。以上の結果は表6にまとめて示した。

【表5】

皮膚の状態	皮膚刺激指数
紅斑発生を認めない	0
微弱な紅斑発生を認める	1
明確な紅斑発生を認める	2
中程度の紅斑発生を認める	3
顕著な紅斑発生を認める	4
浮腫発生を認めない	0
わずかな浮腫発生を認める	1
明確な浮腫発生を認める	2
中程度の浮腫発生を認める	3
1mmを超える浮腫の発生を認める	4

【0019】  
【表6】

試料	皮膚潰瘍の治癒状況			保存安定性	皮膚刺激指數
	完全治癒	ほぼ治癒	治癒不完全		
実施例	1	3	2	○	0.14
	2	3	2	○	0.11
	3	2	3	○	0.15
	4	2	3	○	0.07
	5	2	3	○	0.06
	6	3	2	○	0.08
	7	3	2	○	0.05
	8	4	1	○	0.07
	9	4	1	○	0.09
比較例	1	0	3	×	2.14
	2	0	2	×	1.67
	3	0	3	×	1.43

表6より、本発明の実施例塗布群においては、いずれも皮膚潰瘍の治癒傾向が認められ、治癒が不完全なマウスは見られなかった。特に実施例8及び実施例9塗布群で良好な治癒を認めた。これに対し、比較例塗布群では完全治癒を認めたマウスはなく、ほぼ半数のマウスにおいて治癒が不完全であった。

【0020】また、本発明の実施例については、3カ月経過後においても、いずれも製剤の状態に変化は認められなかった。これに対して、比較例ではすべてに変色が

認められた。皮膚刺激性についても、エタノールを50重量%配合する実施例1～実施例3で若干皮膚刺激指数は高くなっているが、それでも実用的には全く問題のない程度であった。一方、比較例ではいずれも各実施例に比べて皮膚刺激指数は有意に高い結果となった。

### 30 【0021】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明により、安定性及び安全性に優れ、良好な阻害活性を有するコラゲナーゼ阻害剤を提供することができた。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号 庁内整理番号

C 1 2 N 9/99

F I

C 1 2 N 9/99

技術表示箇所